

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-503127

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月6日

(51)Int.Cl.*

C 1 2 N 5/06

識別記号

庁内整理番号

F I

8412-4B

C 1 2 N 5/ 00

E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-507906
(86) (22)出願日 平成4年(1992)10月22日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)4月25日
(86)国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 9 0 1 9
(87)国際公開番号 W O 9 3 / 0 8 2 6 8
(87)国際公開日 平成5年(1993)4月29日
(31)優先権主張番号 7 8 0 , 4 8 8
(32)優先日 1991年10月23日
(33)優先権主張国 米国 (U S)
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,
D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M
C , N L , S E) , C A , J P

(71)出願人 セルプロ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ワシントン州 98021
ボセル アベニュー サウスイースト
22322
(72)発明者 ハイムフェルド シェリー
アメリカ合衆国 ワシントン州 98072
ウッディンヴィル ノースイースト ワン
ハンドレッドアンドナインティエイス ス
トリート 18326
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 幹細胞を選択的に増加する方法

(57)【要約】

(a)幹細胞を他の細胞から分離する工程、及び(b)幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。

請求の範囲

1. (a) 幹細胞を他の細胞から分離すること、及び
 (b) 幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートすること
 を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法。
2. (a) 幹細胞を成熟細胞から周期的に分離すること、及び
 (b) 幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートすること
 を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法。
3. 選択された培養基で幹細胞成長因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
4. 選択された培養基がインターロイキン-3を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
5. 選択された培養基が顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
6. 選択された培養基が顆粒球コロニー刺激因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
7. 選択された培養基がインターロイキン-6を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
8. 選択された培養基が肥満細胞成長因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
9. 幹細胞がアフィニティカラムで分離される請求の範囲第1項又は第2項の方法。
10. 幹細胞がフローサイトメトリーにより分離される請求の範囲第1項又は第2項の方法。
11. 分離された幹細胞がベトリ皿中でインキュベートされる請求の範囲第1項又は第2項の方法。
12. 分離された幹細胞が滅菌バッグ中でインキュベートされる請求の範囲第1項又は第2項の方法。

明細書

幹細胞を選択的に増加する方法

関連出願との相関

本出願は、1990年4月23日に出願された米国特許出願第シリアルNo. 07/512,543の一部継続出願である。

技術分野

本発明は、一般に、骨髄を構成する細胞に関し、また特に、幹細胞の数を選択的に増大させるのに用いられる装置及び方法に関する。

発明の背景

癌は、合衆国における全死亡者の5分の1より多くの原因であり、死亡原因の第2位である。男性における癌の主なタイプは、肺、前立腺、及び結腸直腸癌であり、女性においては乳、肺、及び結腸直腸癌である。最近では、多くの癌は、外科的治療ならびに化学療法及び/又は放射線療法の組合せで処置される。

しかし、化学療法と放射線療法における一つの困難は、これが個人の免疫系、ならびに免疫系の先祖細胞である幹細胞をも破壊することにある。免疫系を再構築するために、患者は一般に同様の又は自己の骨髄を用いて骨髄移植される。しかし、多くの個人は、自身の骨髄が癌に侵されているか又は組織適合の提供者が見つからないために、死亡する。

この困難を克服するために示唆された一つの方法は、移植する細胞の寿命を延長する、長期骨髄培養の使用である。たとえば、デクスター等(J. Cell. Phys. 91: 335, 1976)は、インビトロで幹細胞を増殖するための条件を記載している(以下では、デクスター培養と云う)。簡単に言えば、この方法は、基質細胞の粘着性一層の形成を含み、これは幹細胞及び初期先祖細胞の生育を支持する。しかし、デクスター培養は結局のところ欠点がある。なぜなら、それは、幹細胞及び初期先祖細胞の死亡速度を低下するのみであって、そのような細胞の数の増大という望まれる結果を与えないからである。

本発明は、幹細胞を選択的に増加する装置及び方法を提供する。これら装置及び方法は、従来の装置及び方法の欠点を克服し、かつ更に他の関連する利点と与

13. 分離された幹細胞が中空繊維中でインキュベートされる請求の範囲第1項又は第2項の方法。

14. (a) 幹細胞を他の細胞からアフィニティカラム上で分離すること、及び
 (b) 分離された幹細胞を、幹細胞成長因子、インターロイキン-3及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を含む培養基を含む滅菌バッグ中でインキュベートすること
 を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法。

える。

発明の概要

簡単に言えば、本発明は、幹細胞を選択的に増加するため及び成熟造血細胞を得るための装置及び方法に向けられている。本発明の一面において、(a)幹細胞を他の細胞から分離する工程、及び(b)幹細胞が選択的に増加されるよう選択された培養基中で、分離した幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。本発明の別の面において、(a)幹細胞を成熟細胞から周期的に分離する工程、及び(b)幹細胞が選択的に増加されるよう選択された培養基中で、分離した幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。種々の実施態様において、選択される培養基は、幹細胞成長因子、インターロイキン-3、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インターロイキン-6、または肥満細胞成長因子を含有する。

他の実施態様において、幹細胞は、アフィニティカラムで、又はフローサイトメトリー(フロー式血球計算)によって分離される。更に別の実施態様において、分離された幹細胞は、ベトリ皿、滅菌バッグ又は中空繊維中でインキュベートされる。

本発明の別の実施態様において、(a)幹細胞を他の細胞からアフィニティカラム上で分離する工程、及び(b)幹細胞成長因子、インターロイキン-3、及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を含む培養基を有する滅菌バッグ中で、分離した幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。

本発明のこれらの面及び他の面が、以下の詳細な説明及び添付図面を参照して明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、幹細胞増加における幹細胞分離の効果を、合計細胞数の増加により測定して示すグラフである。

図2は、幹細胞増加に対する幹細胞分離の効果を、CFCの増加により測定して示すグラフである。

図3は、合計細胞数に対する種々の成長因子の効果を示すグラフである。

図4は、CFCの数に対する種々の成長因子の効果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

本発明は、幹細胞を選択的に増加させるための装置及び方法を提供する。本発明の文脈において、「幹細胞」という言葉は、全能性を有する (topotent) 造血細胞ならびに初期先祖細胞たとえばコロニー形成性細胞 (CFC) を云う。これら細胞は、CD34レセプターの存在に基づき、他の細胞から区別される。

上記のように、本発明の一面において、(a)幹細胞を他の細胞から分離する工程、及び(b)幹細胞を増加させることのできる選択された培養基を用いて、分離された幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加する方法が提供される。

下記により詳しく記述される装置及び方法を用いて、たとえば末梢血及び骨髄を含め種々の血液プロダクトから幹細胞を分離される。本発明の目的のために、分離された細胞の少なくとも20%がCD34陽性細胞であるならば、幹細胞が分離されたと考えられる。好ましくは、CD34陽性細胞は、90%より大きい純度を与えるように分離される。加えて、移植する細胞の回収及び生育を低下する減成性酵素の放出、及び癌を妨ぐために、血小板、顆粒白血球及び赤血球の合計数を出来るだけ小さく保つことが望ましい。より詳しくは、幹細胞が、約1%未満の血小板、50%未満、好ましくは約25%未満の顆粒白血球、及び10%未満、好ましくは約1%未満の赤血球を含むことが望ましい。

幹細胞の分離は、これら細胞上の抗原を特異的に認識するリガンドの使用により達成される。たとえば、CD34抗原を特異的に認識する抗体を、下記の装置及び方法で用いて、幹細胞を分離できる。CD34抗原を特異的に認識する抗体の代表例は、My-10及びHPCA2 (ベクトン・ディッキンソン、マウンテンビュー カリフォルニア) 及び12-8 (セルプロ (商標)、ボセル、ワシントン) である。

磁気ビーズ、平皿洗い (penning)、及びフローサイトメトリー (蛍光活性化細胞分画 FACS) (たとえば米国特許明細書第4,714,680号及び4,985,204号参照；これらは引用することにより本明細書に含まれる) の使用を含む種々の

方法及び装置が、幹細胞を分離するために用いられる。特に好ましい方法及び装置は、「免疫選択装置及び方法」という名称の米国特許出願シリアル07/513,543 (引用することによりその全体が本明細書に含まれる) に記載されているようなイムノアフィニティ カラムである。簡単に言えば、この出願は、幹細胞のような標的粒子を、非標的粒子と標的粒子の混合物から単離又は分離する方法及び装置を記載している。標的粒子に特異的に結合することができるリガンドを持つ、低度非特異的結合性の多孔性物質の床を含むカラムに粒子を通過させることにより、直接的方法で標的粒子が分離される装置及び方法のディスカッションがこの出願に含まれる。この出願の一面において、(a)流体がそこを通過してカラムに入りうる入口穴を有する基盤端、及び流体がそこを通過してカラムから出うる出口穴を有する末梢端を有するカラム、(b)カラム内に低度非特異的結合性の多孔性物質の床を一般に有し、該多孔性物質はその表面に固定化されたビオチン吸着性基を有するところの装置が提供され、ここで多孔性物質の孔のサイズは、ビオチン吸着性基が孔に入ることを許すのに十分であり、しかし床の崩壊を許す程に大きくなく、また床の間隙のサイズは粒子が床を通過するのを許すのに十分である。該装置は更に、結合された標的粒子が多孔性物質から開放されるように外部力を加えて多孔性物質を攪拌する手段をカラム内に有する。この出願の他の面において、標的粒子は、アビシン及びビオチンを用いる一段階又は二段階法により分離される。しかし、本発明の目的のためには、イムノアフィニティ カラム内でたとえば非多孔性物質のような他の物質を用いることを注意しておく。

特に好ましいイムノアフィニティ カラムは、「細胞分離のための改修された装置及び方法」という名称の米国特許出願 (代理人のドケット № 200072,407) (引用することにより、他の全体を本明細書に含める) に記載されている。簡単に言えば、この出願の一面において、試料流体から標的細胞を分離するためのカラム組立体を含む「細胞セパレーター」が提供され、カラム組立体は、カラム、試料流体供給バッグ、及び流体収集バッグを含み、ここでカラムは試料流体供給バッグから試料流体を受け取り、試料流体から標的細胞を分離し、そして標的細胞を保持するために備えられ、また流体収集バッグはカラムから放出された後の

標的細胞を受け取るために備えられている。該細胞セパレーターは、カラム内に保持された試料細胞の放出を助けるためにカラム内容物を攪拌するための攪拌手段 (該攪拌手段は、試料細胞が放出される速度を変えるためにカラム内容物の攪拌の量を変えるための駆動シグナルに応答する)、カラムから流出して流体収集バッグに流入する流体の光学密度を示すカラムシグナルを与えるためのカラムセンサー手段、カラムから流出する流体が選択的に流体収集バッグへ流入できるようにするカラムバルブ制御シグナルに応答するカラムバルブ手段、及び細胞セパレーターの運転を制御するためのデータ処理手段 (該データ処理手段は、駆動シグナルを与えるためのカラムシグナル、及び不十分な濃度の標的細胞が集められることを防ぐためのカラムバルブ制御シグナルに応答する) を含む。この発明の一実施形態は、セルプロ (ボセル、ワシントン) から入手できるCEPRATE LC (商標) 細胞分離システムである。

分離された細胞は次に、幹細胞が選択的に増加されるように選択された培養基中でインキュベートされる。本発明の文脈において、幹細胞の数は、他の細胞タイプ全体よりもより増大するならば、幹細胞は「選択的に増加」される。簡単に言えば、該培養基は、細胞生育を維持する栄養基、ならびに幹細胞の数を増加する因子を含まねばならない。栄養基の代表例は、RPMI、TC199又はIscove DMEMであり、これらは蛋白質たとえば胎児ウシ血清を補われている。あるいは、栄養基は、Ex Vivo のような規定された培養基でありうる。種々の成分が、幹細胞を選択的に増加させるために用いられる。代表的な因子は、インターロイキン-1、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-7、SCF、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、TGF- β 、TNF- α 、 α -INF、FGF、PDGF、IGF-1、及びIGF-2を含む。特に好ましい因子は、幹細胞成長因子 (アムゲン、サウザン、オックス、カリフォルニア)、インターロイキン-1、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (イムネックス、シアトル、ワシントン)、顆粒球コロニー刺激因子、インターロイキン-6 (アムゲン、サウザン、オックス、カリフォルニア) 及び肥満細胞成長因子 (イムネックス、シアトル、ワシントン) を含む。

上記のように幹細胞を精製し、それを選択された培養基と共に後記のようにインキュベートすることによって、培養基が選択的に幹細胞を増加させるか否か容易に決定できる。幹細胞及び他の細胞の数は、インキュベーションの前後に及び後にカウントされる。上記のように、もし幹細胞の数が増大し、他の細胞がそうでないならば、幹細胞は選択的に増加された。細胞の合計数は、標準的な手法 (たとえば血球計数器) によりカウントでき、幹細胞の数は、フローサイトメトリー (すなわち、蛍光的に結合された抗CD34抗体でラベルされた細胞がFACSによりカウントされる)、又は実施例3で述べたようにカウントされる。

分離された細胞は、種々の容器でインキュベートされる。特に好ましい容器は、ベトリ皿 (コーニンググラス ワークス、コーニング、ニューヨーク)、8穴プレート (コスター)、ガス透過性減菌バックたとえば Stericell (テルモ、エルクトン、メリーランド) 及び Lifecell (バクスター、デアフィールド、イリノイ)、及び中空繊維たとえば Cellphar 2 (ユニシシ ファイバテック、サンジェゴ、カリフォルニア)、Accusys (エンドトロニクス、ミネアポリス、ミネソタ)、又は Vitaliber (アミコン、ダンバース、マサチューセッツ) を含む。好ましくは、細胞は5%~10% CO₂ の雰囲気かつ約37℃の温度でインキュベートされる。

本発明の他の面において、(a)幹細胞を成熟細胞から周期的に分離する工程、及び(b)幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。簡単に言えば、成熟細胞 (これは、最終的に分化された血細胞のみでなく、中間的な系統をも含む) は、幹細胞の増加及び分化をフィードバック制御メカニズムを介して禁止すると考えられる。すなわち、培養物からの成熟細胞の除去は、幹細胞の元の数の何倍もの幹細胞の増加を許す。本発明の文脈において、周期的分離は、少なくとも10日毎に成熟細胞の除去を意味する。

周期的に幹細胞を分離するために、種々の方法が用いられている。たとえば一実施形態において、細胞が上記のようにアフィニティカラム上で分離され、上記の容器のいずれかを用いて、選択された培養基中でインキュベートされ、そして次に、新たに分化された成熟細胞から幹細胞を分離するために再分離される。

本発明の別の面において、幹細胞が選択的に増加されるように選択された培養基を循環しながら、幹細胞を連続的に分離する。簡単に言えば、一実施態様において、これは分離装置（たとえば上記のアフィニティカラム）に選択された培養基を連続的に循環することにより行われる。幹細胞は分離装置中に保持され、一方、成熟細胞（これはCD34抗原を持たない）は装置を通過する。幹細胞が成長し、数が増大すると、新しい幹細胞は同様の分離装置に粘り、一方、新たに分化した、CD34抗原を有さない細胞は装置を通過する。

本発明の別の実施態様において、成熟細胞上に見られる表面抗原に対する固定化されたリガンドを予めコーティングされたビーズを循環装置に通過させることにより、幹細胞は循環装置中で連続的に分離される。従って、成熟細胞が結合され、ビーズにより循環装置から運び去られる。

下記の実施例は、例示のためのものであり、限定するためのものではない。

実施例1

アビジン化されたバイオゲルの調製

A. ポリアクリルアミドゲルのカルボキシル化

17gの乾燥バイオゲルP-80（50〜100メッシュ（強）、粗ビーズ）（バイオラド、カタログNo.150、1630、リッチモンド、カリフォルニア）を、1.5リットルの0.5M NaHCO₃/0.5M Na₂CO₃に加える。NaOHを用いてpHを10.5に調整し、ビーズを損つけないように注意深く約20〜30分間、ミキサー（RZR1、カルファモ、ウィアトン、オントリオ、カナダ）で混合する。ミキサーを次に、80℃水浴中に置く。混合物が80℃に達した後、それをたまたま攪拌しながら更に2時間（80℃で）インキュベートする。混合物を次に水浴から取出し、水浴中に入れて混合物温度を室温へ下げる。

蒸留水又は脱イオン水を用いてビーズを数度洗い、次に真空源に接続された粗ガラスフィルターを用いてPBSで数度洗う。該カルボキシル化されたゲルはPBS中で4℃で貯蔵でき、もし滅菌される場合は保存剤と共に貯蔵されるなら1年間まで安定である。

(Cellpro, ボセル, ワシントン) の20μg/mlの最終濃度で、室温で25分間インキュベートする。次に抗体-細胞混合物を、PBSを用いて180×gで10分間遠心分離して洗う。細胞を次に再懸濁して、PBS1ml中1×10⁶白血細胞の濃度とする。

C. カラム操作及び結果

CEPRATE LC（商標、ボセル、ワシントン）分離系を、製造者の指示に本質的に従って用いた。簡単に云うと、装置をセットアップし、チューブを接続し、試薬を充填し、抗体処理された細胞を用いて実験を始めた。細胞は、ポンプによってカラムに送られ、カラムはPBSで洗われ、そして、吸着された細胞は電気駆動インベラーによって放出された。吸着された細胞は、収集バッグ中に集められた。

D. 結果

100個の骨髄細胞がカラムを通された：

2個の細胞がカラムに結合され、収集バッグ中に回収された。収集された細胞の生育性は、トリパンブルー排除により測定して、91%であった。収集された細胞は、FACS分析によると、75%CD34⁺であった。

実施例3

CFC生育性の測定及び回収

2mMのレーグルタミン及び50ng/mlのゲンタマイシンを補われたIscoreのメチルセルロー（テリーフォックスラボラトリーズ、バンクーバー、ブリタニッシュ・コロンビア、カナダ）の、35mmプレート当たり1mlを37℃に温めた。アッセイの精度を改善するために、細胞を3倍希釈で3重にプレートした。プレートされた細胞の最大数は、10³/プレートであった。但し、カラム精製された細胞は、3×10³及び未満でプレートされた。細胞を各プレートの表面に均一にスプレーし、37℃で5%CO₂の空気中で10〜14日間、加温インキュベーター中でインキュベートした。コロニーが50より多い細胞を含んでいたら、コロニーをカウントし、CFU-GM、BFU-E又は他（たとえばCFU-GE/MM）として記録された。種々のタイプのコロニーの数は合計されて、コロニー形成性細胞（CFC）の合計数を与える。

B. カルボキシル化されたバイオゲルのアビジン結合

まず、真空源に接続された粗ガラスフィルターで濾過することにより、測定された量のカルボキシル化バイオゲルからPBSを除去する。ゲルを次に、蒸留水又は脱イオン水中で15〜30分間平衡化する。水中での平衡化は、予め測定した体積の約4倍へのゲルの膨脹を起す。ゲルの1ml当たり（PBS中で当初測定）、蒸留水又は脱イオン水の10ml中にゲルを再懸濁する。

当初測定したゲルの1ml当たり30mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC-HCl）（シグマケミカル社、カタログNo. E7750、セントルイス、ミズリー）を加える。HClを滴下することによりpHを迅速に5.5に調節する。pHを5.5に維持するよう注意する；5.0未満又は6.0より大きいpHは、バイオゲルの著しく小さい活性化を結果する。混合物を5分間攪拌する。

アビジン（インターナショナル・エンザイム社、フォールブロック、カリフォルニア）を、脱イオン水に10〜100mg/mlの濃度で溶解する。次に、ゲルの1ml（PBS中で当初測定）当たり1mgのアビジンを迅速に加える。混合物を1.5時間攪拌する。次に2Mのグリシンを加えて、混合物において0.2Mグリシンの最終濃度にし、更に1時間攪拌する。

粗ガラスフィルター及び真空を用いて、ゲルを数体積量のPBSで洗い、4℃でPBS中に貯蔵する。ゲルは、約1年間安定である。

実施例2

移植する細胞の単離

A. 豚皮膚細胞（buffy coat cell）の調製

骨髄の試料を240×gで15分間遠心分離する。血漿を除く（後の使用のために保持しておく）、そして残った豚皮膚細胞を再び240×gで15分間遠心分離して、赤血球細胞を除く。豚皮膚細胞を、RPMIを用いて180×g、10分間の遠心分離により二度洗う。次に細胞を再懸濁して、RPMI+1%BSAの1ml中1×10⁶白血細胞の最終濃度とする。

B. 豚皮膚細胞と抗体とのインキュベーション

豚皮膚細胞の懸濁物を、ビオチン化した（biotinylated）抗CD34抗体

実施例4

幹細胞増加

A. 分離された幹細胞と全骨髄中の幹細胞との増加の比較

実施例2記載のように精製された幹細胞を、RPMI 1640、10%胎児ウシ血清（HYCLONE、ロガン、ユタ）、50ng/ml幹細胞成長因子、50ng/mlインターロイキン-3、20ng/ml顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、及び20ng/ml顆粒球コロニー刺激因子を含む培養液中で成長させた。細胞は、培養基1ml中、プレート当たり10³でプレートされた。第7、14及び21日に細胞を取除き、実施例3記載のようにCFCアッセイのための再プレートした。生育性細胞を、トリパンブルーを用いる血球計数器によりカウントした。

図1で合計細胞カウントにより示されるように、及び図2でCFCの数により示されるように、細胞を培養する前の幹細胞分離は、幹細胞成長及び増加を劇的に改善した。

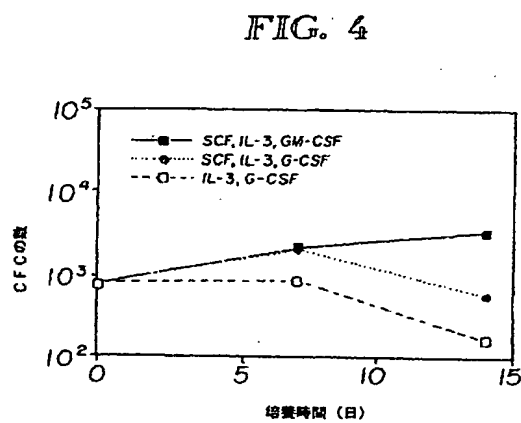
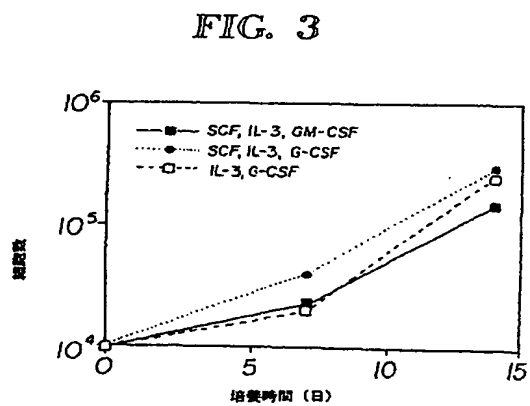
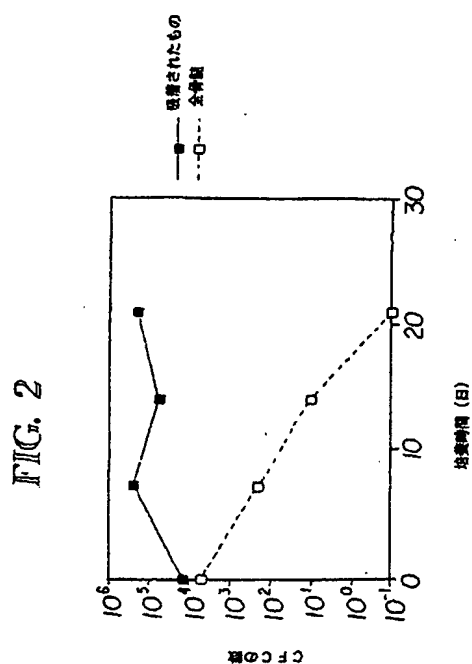
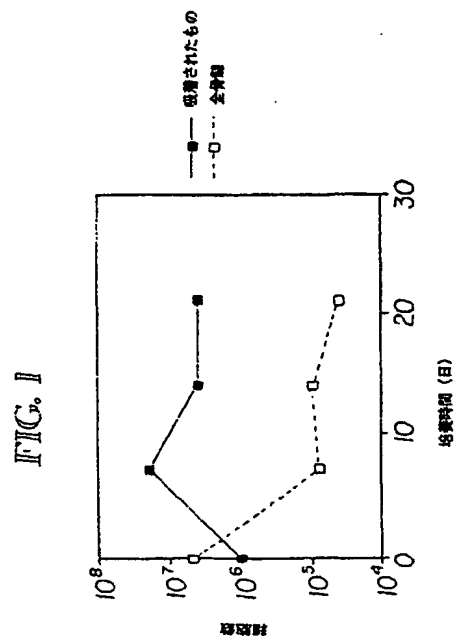
B. 幹細胞増加を起こす因子

幹細胞を増加させるためにどの成長因子が有用であるかを決めるために、下記のアッセイを行った。簡単に云えば、上記のように精製された幹細胞を、コーニング35mmプレート中のプレート当たり10³細胞の密度でプレートした。該細胞に、10%胎児ウシ血清及び下記成長因子の種々の組合せを補われたRPMI 1640を含む培養液を加えた。

(1) 50ng/ml幹細胞成長因子（アムゲン、サウザンドオークス、カリフォルニア）、(2) 50ng/mlインターロイキン-3、(3) 20ng/ml顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（イムネックス、シアトル、ワシントン）、及び(4) 顆粒球コロニー刺激因子（ゲンザイム、ケンブリッジ、マサチューセッツ）。

図3及び4に示されるように、SCFを含む二つの培養基は幹細胞を増加させた（CFC数の増加で測定して）。

上記から、本発明の特定の実施態様が、例示のためにここに記述されたが、種々の変更が本発明の精神及び範囲からそれることなくなされうることが理解される。従って、本発明は添付の請求の範囲によってのみ限定される。



国际调查报告

PCT/US 92/09019

A. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER (Of course classification requires search, reference and according to International Patent Classification (IPC) or to both National Classifications and IPC)	
Int.Cl. 5 C12H5/08	
B. PRIOR ART SEARCHED (Indicate the documents searched)	
Classification System	Classification System
Int.Cl. 5	C12N 1 A61K
Documents searched other than Abstracts Dissemination to the extent that such Documents are included in the Search Report	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*	
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages of the document
X	EP.A.0 341 966 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 16 November 1989 see page 4, line 96 - page 5, line 12; claims
X	EP.A.0 491 811 (SYSTEMS, INC.) 16 October 1991 see page 6, line 14 - line 23; claims
P,X	EP.A.0 455 482 (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 6 November 1991 see page 8, line 20; claims 1-8, 16, 17, 20, 21
* Special categories of cited documents: (1) "A" documents relating to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" documents which are cited as prior art for the purposes of the search "P" documents which are cited as prior art for the purposes of the search and which are of particular relevance "Y" documents which are cited as prior art for the purposes of the search and which are of particular relevance "Z" documents which are cited as prior art for the purposes of the search and which are of particular relevance	
IV. CERTIFICATION Date of the actual Completion of the International Search 29 JANUARY 1993	
Date of Filing of the International Search Report 18. 01. 93	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	
Signature of Authorised Officer RYCKENBOSCH A.O.	

Form PCT/ISearch/1992 (Rev. 01/92)

PCT/US 92/09019

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages of the document
P,X	WO.A.9 201 039 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE ET AL.) 23 January 1992 see page 4, line 14 - page 5, line 28; claims 1-13; example 3 see page 9, line 7 - line 27
	1-14

Form PCT/ISearch/1992 (Rev. 01/92)

国际调查报告

US 9209019
SA 66411

This report lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
 The numbers are as contained in the European Patent Office (EPO) file no. 14/92193.
 The European Patent Office is to be used for the purposes of the search.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A- 0341966	15-11-89	US-A- 5087570	11-02-92
		JP-A- 2042978	13-02-90
EP-A- 0451813	16-10-91	US-A- 5051620	29-10-91
		AU-A- 7198591	03-10-91
EP-A- 0455482	06-11-91	AU-A- 7429391	07-11-91
WO-A- 9201039	23-01-92	US-A- 5154921	13-10-92

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

フロントページの続き

(72)発明者 ベレンソン ロナルド ジェイ
アメリカ合衆国 ワシントン州 98040
マーサー アイランド エイティフォース
アベニュー サウスイースト 6127

(72)発明者 フェイ ルイガオ
アメリカ合衆国 ワシントン州 98115
シアトル 1 トゥエンティサード アベ
ニュー ノースイースト 8519

(72)発明者 ゴフ ランダル エイ
アメリカ合衆国 ワシントン州 98021
ボセル トゥーハンドレッドアンドトゥエ
ンティフィフス ブレイス サウスイース
ト 508

(72)発明者 ピーターソン デイル アール
アメリカ合衆国 ワシントン州 98021
ボセル トゥエンティエイス アベニュー
サウスイースト 18630

(72)発明者 ポーター クリストファー エイチ
アメリカ合衆国 ワシントン州 98072
ウッディンヴィル ノースイースト ワン
ハンドレッドアンドトゥエンティセヴンス
ブレイス 19756